蒙脱石对产蛋鸡生产性能和盲肠菌群的影响

陈继发[1,2]　彭灿阳[1,2]　曲湘勇[1,2*]　季　方[3]

（1. 湖南农业大学动物科学技术学院，长沙 410128；2.湖南畜禽安全生产协同创新中心，长沙 410128；3.美国安牧然国际公司，芝加哥 IL 60611）

摘　要：本试验旨在研究蒙脱石对产蛋鸡生产性能和盲肠菌群的影响。选取 480 只 75 周龄的罗曼蛋鸡，随机分成 5 组，每组 8 个重复，每个重复 12 只。对照组饲喂基础饲粮，试验组分别在基础饲粮中添加 0.3、0.6、0.9 和 1.2 g/kg 的蒙脱石。预试期 7 d，正试期 70 d。结果表明：1)与对照组相比，0.9 g/kg 蒙脱石组产蛋鸡试验第 1~5 周日产蛋量显著提高（P<0.05），试验组料蛋比有降低的趋势（P=0.073）。2)0.3、0.9 和 1.2 g/kg 蒙脱石组测序获得的有效序列和优质序列均多于对照组（P>0.05）。3)试验组的 Beta 多样性提高，与对照组相比，试验组 Shannon 指数有提高的趋势（P=0.096），Simpson 指数呈降低的趋势（P=0.095）。4)在门水平上，与对照组相比，试验组厚壁菌门、变形菌门和螺旋体门的物种丰度均有提高（P>0.05）；0.9 g/kg 蒙脱石组中 WPS_2 相对含量显著增加（P<0.05）；0.3 g/kg 蒙脱石组迷踪菌门丰度显著降低（P<0.05）。在属水平上，与对照组相比，试验组瘤胃球菌属的物种丰度显著提高（P<0.05），紫单胞菌属呈提高的趋势（P=0.067）；0.6 和 1.2 g/kg 蒙脱石组多尔氏菌属和布劳特氏菌属的物种丰度显著提高（P<0.05）；0.6 g/kg 蒙脱石组中帕拉普氏菌属的物种丰度显著提高（P<0.05）。5)属水平上聚类分析显示，试验组与对照组的肠道菌群相似度降低。由此可见，蒙脱石在一定程度上影响了产蛋鸡盲肠菌群的多样性及物种丰度，饲粮中添加 0.9 g/kg 蒙脱石有提高产蛋鸡生产性能的趋势。

关键词：蒙脱石；生产性能；肠道微生物；高通量菌群；产蛋鸡

中图分类号：S831　　文献标识码：A　　文章编号：

动物肠道是一个开放的生态系统，栖居着大量的微生物。肠道菌群的稳态对维持宿主的生长发育、营养吸收和免疫应答等生理功能均具有重要作用。许多因素能够影响肠道菌群的组成及其多样性，研究证实，霉菌毒素能够降低动物肠道微生物多样性，破坏肠道正常菌群的生态平衡，进而产生一系列毒性效应[1-2]；此外，动物肠道中过度繁殖的病原菌能造成肠道菌群失衡，破坏肠黏膜屏障功能，降低营养物质吸收和机体免疫防御能力，进而降低动物

收稿日期：2017－04－26
基金项目：湖南畜禽安全生产协同创新中心专项资金（CICAPS）；湖南农业大学产学研合作项目（13098）；湖南省研究生科研创新项目（CX2016B299）
作者简介：陈继发（1992—），男，湖南邵阳人，博士研究生，研究方向为家禽营养与健康养殖。E-mail: jifachen66@yeah.net
*通信作者：曲湘勇，教授，博士生导师，E-mail: quxy99@126.com

的生产性能，甚至增加死亡率[3-4]。因此，控制生物毒素诱导的肠道微生物紊乱，维护动物肠道健康具有重要意义。蒙脱石是一种铝硅酸盐类黏土，其拥有巨大的比表面积，表面分布着无数微孔，具有很好的吸附性和离子交换能力，已被证实能在肠道中吸附细菌和霉菌毒素[5-6]。Xia 等[7]和 Hu 等[8]研究表明，蒙脱石能显著减少肉鸡小肠和盲肠中大肠杆菌和梭菌的数量；蒙脱石在不同程度上降低了断奶仔猪回肠和结肠中大肠杆菌、梭菌和沙门氏菌的数量[9-10]；此外，蒙脱石能增加奶牛瘤胃中具有降解臭气味物质的菌属，减少瘤胃纤维分解菌和肠道病原菌——弗氏志贺菌属[11]。但这些研究主要基于传统的体外培养法和变性梯度凝胶电泳（PCR-DGGE）法，只局限于特定细菌或一定丰度的微生物，对未知微生物均未涉及，且其准确度也不尽理想，不能充分反映蒙脱石对肠道微生物菌群的影响。本课题组前期的研究发现蒙脱石提高了产蛋高峰期蛋鸡的生产性能[12]，我们猜想蒙脱石或许能够延缓产蛋鸡产蛋末期生产性能的降低，进而延长产蛋周期。此外，鉴于肠道微生物与宿主免疫、营养吸收和生长发育的相关性，我们猜测其对蛋鸡生产性能的影响与肠道菌群存在一定关联。因此，本试验在产蛋末期蛋鸡饲粮中添加不同水平的蒙脱石，探讨其对产蛋鸡生产性能的影响；并采用准确性高、信息量大的宏基因组测序技术，结合生物信息学分析技术，定性、定量地探究蒙脱石对产蛋鸡盲肠微生物组成、菌群多样性和物种丰度的影响，以全面、准确地评估蒙脱石在维护肠道微生物屏障中所发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 试验设计与饲养管理

选取 480 只 75 周龄、体重相近、健康的罗曼蛋鸡，随机分成 5 组，每组 8 个重复，每个重复 12 只。对照组饲喂基础饲粮，试验组分别在基础饲粮中添加 0.3、0.6、0.9 和 1.2 g/kg 的蒙脱石。预试期各组统一饲喂基础饲粮，每天对鸡群进行观察，并及时调整鸡群，使各组产蛋鸡的饲粮消耗量、产蛋率和蛋重差异不显著。预试期 7 d，正试期 70 d。试验基础饲粮参考《NY/T 33—2004 鸡饲养标准》配制，基础饲粮组成及营养水平见表 1。

表 1 基础饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 1 Composition and nutrient levels of the basal diet（air-dry basis） %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	64.00
豆粕 Soybean meal	22.00

石粉 Limestone	9.00
预混料 Premix[1)]	5.00
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels[2)]	
代谢能 ME/(MJ/kg)	11.32
粗蛋白质 CP	15.58
赖氨酸 Lys	0.78
蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	0.56
钙 Ca	3.93
有效磷 AP	0.36

[1)]预混料为每千克饲粮提供 The premix provided the following per kg of the diet：VA 6 000 IU,VB_2 5.5 mg,VD_3 2 500 IU,VB_1 1.75 mg,VB_6 4 mg,VB_{12} 0.017 5 mg,VE 25 mg,VK_3 2.25 mg,生物素 biotin 0.14 mg,叶酸 folic acid 0.9 mg,烟酸 nicotinic acid 34 mg,泛酸 pantothenate 12 mg,植酸酶 phytase 400 U,胆碱 chloride 300 mg,Fe 75 mg,Cu 7.5 mg,Zn 60 mg,Mn 60 mg,I 0.75 mg,Se 0.15 mg,Ca 9.5 g,P 2.0 g,食盐 NaCl 3.7 g。

[2)]营养水平均为计算值。The nutrient levels were calculated values.

试验产蛋鸡采用开放式鸡舍上、中、下 3 层阶梯式笼养，每笼 3 只，每 4 笼 1 个重复，各组的试验鸡保证分布在上、中、下层的数量相等。每日喂料 2 次（08:00 和 14:30），上午、下午各匀料 2 次。各组饲养管理条件相同，试验第 1~5 周鸡舍温度、湿度分别为（20.64±1.76）℃、（68.90±0.90）%；第 6~10 周鸡舍温度、湿度分别为（22.60±1.04）℃、（74.46±2.74）%。鸡只自由采食、饮水，每日光照时间为 16 h，自然光照和人工光照相结合。每日清扫鸡舍 1 次，每周对鸡舍带鸡喷雾消毒 1 次，每隔 3 d 清粪 1 次。

1.2 试验材料

试验用的蒙脱石由美国安牧然国际公司提供，其主要成分为：钙蒙脱石>70%，无定形水合二氧化硅>15%，其他矿物元素<15%。

1.3 生产性能测定

正式饲养期内，每日记录各组（以重复为单位）产蛋数、蛋重、软破壳蛋数及死淘鸡数，每周统计 1 次采食量。计算统计期内的平均日采食量、产蛋率、平均蛋重、料蛋比和日产蛋量。

1.4　肠道微生物分析

1.4.1　样品采集

试验第 70 天，从每组随机选取 8 只鸡（每个重复 1 只），颈部放血死亡后剖开腹腔，取盲肠内容物置于 1.5 mL 的高压灭菌离心管中，并迅速放置液氮中保存，然后放入－80 ℃冰箱冻存。

1.4.2　细菌 DNA 提取及检测

分别从每组的 8 份盲肠内容物样品中随机选取 6 份，每份称取（200±10） mg 置于 2 mL 离心管中，采用粪便基因组 DNA 提取试剂盒（DP328，天根生化科技有限公司）提取盲肠内容物 DNA，严格按照试剂盒使用说明进行操作。用超微量分光光度计（NanoDrop ND-2000 UV，赛默飞世尔科技公司）检测 DNA 浓度，0.8%琼脂糖凝胶电泳检测纯度，之后将合格的 DNA 样品送深圳华大基因科技服务有限公司测序分析。

1.4.3　Illumina MiSeq 宏基因组测序

利用 Illumina MiSeq 平台进行 Barcoded Illumina Miseq 测序，对样品 16S rRNA 的 V4 区建立文库并上机测序。具体操作如下：选择 16S rDNA 的 V4 区作为目的扩增区域，用引物对 515F/806R 目的片段进行扩增。根据 PCR 产物浓度进行等量混样，充分混匀后使用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。目标条带用 DNA 切胶回收试剂盒进行回收，得纯化样本，并用 BioTek 酶标仪测定各样本浓度并定量。每个样品 DNA 等量混合，采用标准的 Illumina TruSeq DNA 文库制备流程构建所需的宏基因组上机文库，最后在 Illumina Miseq 分析平台上进行 Barcoded Illumina Miseq 测序，采用 PE250 测序策略。

1.5　数据处理与分析

对经过双端（pair-end）测序的数据进行质量控制，截断或舍弃低质量序列（50 个连续碱基平均质量>Q30，接头污染、含有 N 和低复杂度的 reads）。用软件 Flash（v1.2.11）连接通过质量控制的序列，舍弃无法连接的序列。利用软件 USEARCH（7.0.1090）去掉纯化后数据的嵌合体，应用 Qiime 分析软件（1.8.0）合并去掉嵌合体的数据，并将数据按照 Ulust 算法将序列相似性≥97%的操作分类单元（operational taxonomic unit,OTU）进行聚类。选取每个类最长的序列为代表序列，通过 RDP-classifier（v2.2）软件将 OTU 代表序列与数据库有比对进行物种注释，得到每个 OTU 的分类学信息。通过软件 Mothur（1.31.2）对生成的 OTU 信息进行细菌群落多样性和丰富度分析。

微生物测序数据采用 SAS 9.2 统计软件进行 Kruskal-Wallis 秩和检验，生产性能数据进行单因素方差分析（one-way ANOVA），然后通过 Duncan 氏法进行多重比较。试验结果以

平均值和标准误（SEM）表示，用 $P<0.05$ 表示差异显著，$0.05<P<0.10$ 表示有提高或降低的趋势。

2 结 果

2.1 蒙脱石对产蛋鸡生产性能的影响

由表 2 可知，试验第 1~5 周，0.9 g/kg 蒙脱石组产蛋鸡日产蛋量较对照组、0.3 和 0.6 g/kg 蒙脱石组显著提高（$P<0.05$）；试验组组料蛋比较对照组有降低的趋势（$P=0.073$），其中 0.9 g/kg 蒙脱石组料蛋比较对照组降低了 9.69%（$P>0.05$）。

表 2 蒙脱石对产蛋鸡生产性能的影响

Table 2 Effects of montmorillonite on performance of laying hens

项目 Items	时间 Time/周	蒙脱石添加水平 Montmorillonite supplemental levels/(g/kg)					SEM	P 值 P-value
		0	0.3	0.6	0.9	1.2		
平均日采食量 Average daily feed intake/g	1~5	108.32	109.21	108.41	110.65	109.46	0.44	0.467
	6~10	103.58	101.82	102.21	104.47	104.69	0.43	0.167
	1~10	105.86	106.89	106.06	107.55	106.09	0.44	0.730
产蛋率 Laying rate/%	1~5	70.68	71.99	71.04	77.25	73.85	0.90	0.123
	6~10	63.02	63.68	63.18	66.64	63.60	0.71	0.494
	1~10	66.81	68.20	67.49	71.95	68.15	0.72	0.191
料蛋比 Feed to egg ratio	1~5	2.27	2.26	2.25	2.05	2.18	0.03	0.073
	6~10	2.54	2.54	2.50	2.50	2.62	0.02	0.620
	1~10	2.39	2.39	2.38	2.24	2.37	0.02	0.123
日产蛋量 Daily egg production/g	1~5	47.95[b]	48.54[b]	48.33[b]	54.71[a]	50.46[ab]	0.83	0.049
	6~10	40.88	40.92	40.41	41.87	40.03	0.46	0.784
	1~10	44.36	44.99	44.72	48.31	44.87	0.55	0.130
平均蛋重 Average egg weigh/g	1~5	67.90	67.41	67.99	70.66	68.31	0.50	0.282
	6~10	64.75	64.28	64.21	63.96	63.82	0.19	0.573
	1~10	66.42	65.97	66.24	67.45	66.19	0.29	0.716

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$），相同字母或无字母表示差异不显著（$P>0.05$）。下表同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference（P<0.05）, while with the same or no letter superscripts mean no significant difference（P>0.05）. The same as below.

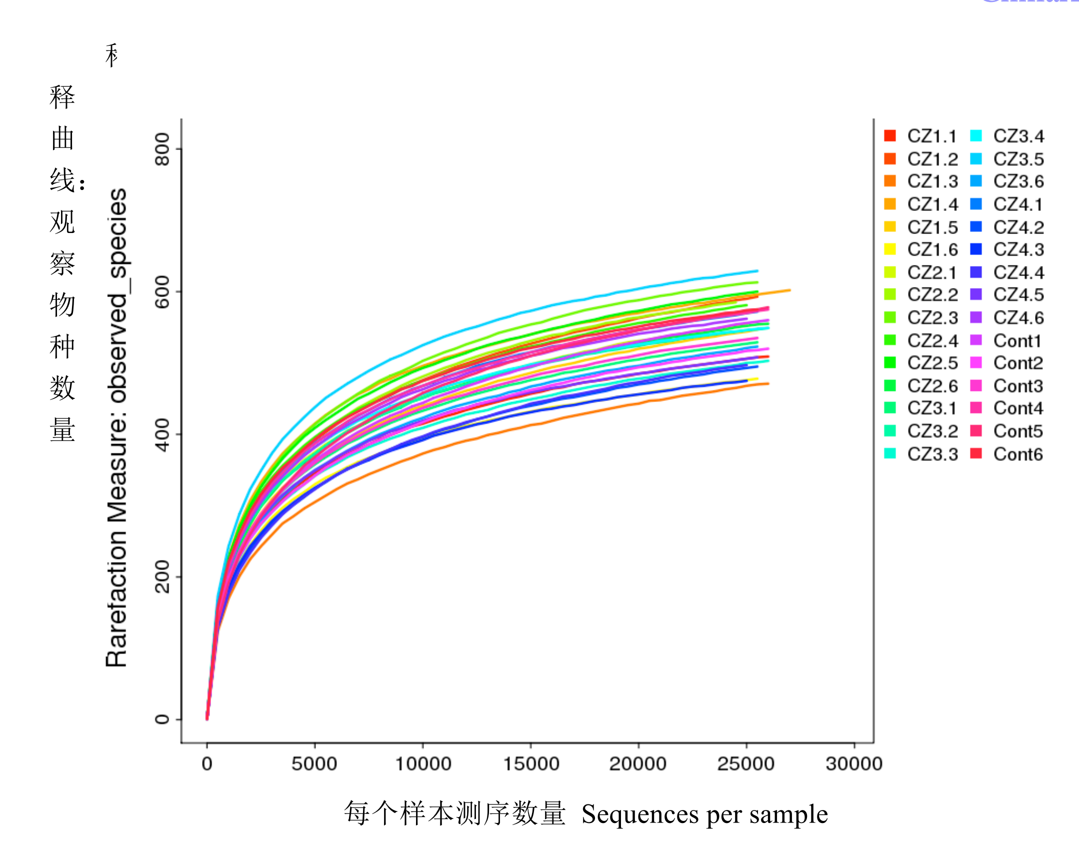
2.2 蒙脱石对产蛋鸡盲肠菌群测序数据的影响

由表 3 可知，除 0.6 g/kg 蒙脱石组外，其余试验组获得的有效序列和优质序列均多于对照组（P>0.05）。反映 97%相似度下样品取样深度的稀释曲线见图 1，每个样品均在 27 000 条左右，表明取样深度一致；此外，物种观察指数稀释曲线随着测试深度的不断加深而逐渐增加，且达到了平台期，说明测序深度已经基本覆盖到样品中的所有物种。

表 3 97%相似性水平下物种丰富度和多样性指数

Table 3 Richiness and diversity index of species at 97% similarity level

项目 Items	蒙脱石添加水平 Montmorillonite supplemental levels/(g/kg)					SEM	P 值 P-value
	0	0.3	0.6	0.9	1.2		
有效序列 Effective sequences/条	35 705	35 823	35 568	35 918	35 784	47.61	0.188
优质序列 Good sequences/条	35 441	35 618	35 342	35 638	35 450	48.21	0.241
Chao 指数 Chao index	646.51	610.07	653.21	623.24	585.10	8.64	0.107
Ace 指数 Ace index	640.38^{ab}	603.07^{ab}	659.71^{a}	613.61^{ab}	587.25^{b}	8.46	0.035
Shannon 指数 Shannon index	4.60	4.66	4.83	4.75	4.63	0.03	0.096
Simpson 指数 Simpson index	0.025	0.021	0.019	0.020	0.024	0.001	0.095



Cont 为对照组样本；CZ1、CZ2、CZ3 和 CZ4 分别为 0.3、0.6、0.9 和 1.2 g/kg 蒙脱石组样本。下图同。

Cont indicates the sample in control group; CZ1, CZ2, CZ3 and CZ4 indicate the samples in 0.3, 0.6, 0.9 and 1.2 g/kg montmorillonite group, respectively. The same as below.

图 1　产蛋鸡盲肠内容物样本测序序列稀释曲线（相似度:97%）

Fig.1　Rarefaction curve of sequenced reads in cecal content samples of laying hens （similarity: 97%）

2.3　蒙脱石对产蛋鸡盲肠菌群 Alpha 多样性的影响

将各组样品所有序列按 97%的相似度进行 OTU 聚类，利用程序运算得到评价样品中群落丰富度和多样性的 Alpha 多样性指数，见表 3。各组间 Chao 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数差异不显著（P>0.05）。0.6 g/kg 蒙脱石组的 Ace 指数显著高于 1.2 g/kg 蒙脱石组（P<0.05），蒙脱石对 Shannon 指数有提高的趋势（P=0.096），对 Simpson 指数有降低的趋势（P=0.095）。

2.4　蒙脱石对产蛋鸡盲肠菌群 Beta 多样性的影响

Beta 多样性分析可以比较不同样品间在物种多样性方面存在的差异大小。经主坐标分析（principal coordinates analysis,PCoA）方法分析，见图 2。结果显示对照组（朝右边三角形）与试验组能较好地区分，且菌群结构分布（画圈）相对紧凑，相似度较高；而各试验组菌群结构分布零散、相似度低，多样性较对照组提高，尤其是 0.6 g/kg 蒙脱石组（朝上三角

形）和 1.2 g/kg 蒙脱石组（朝下三角形）。

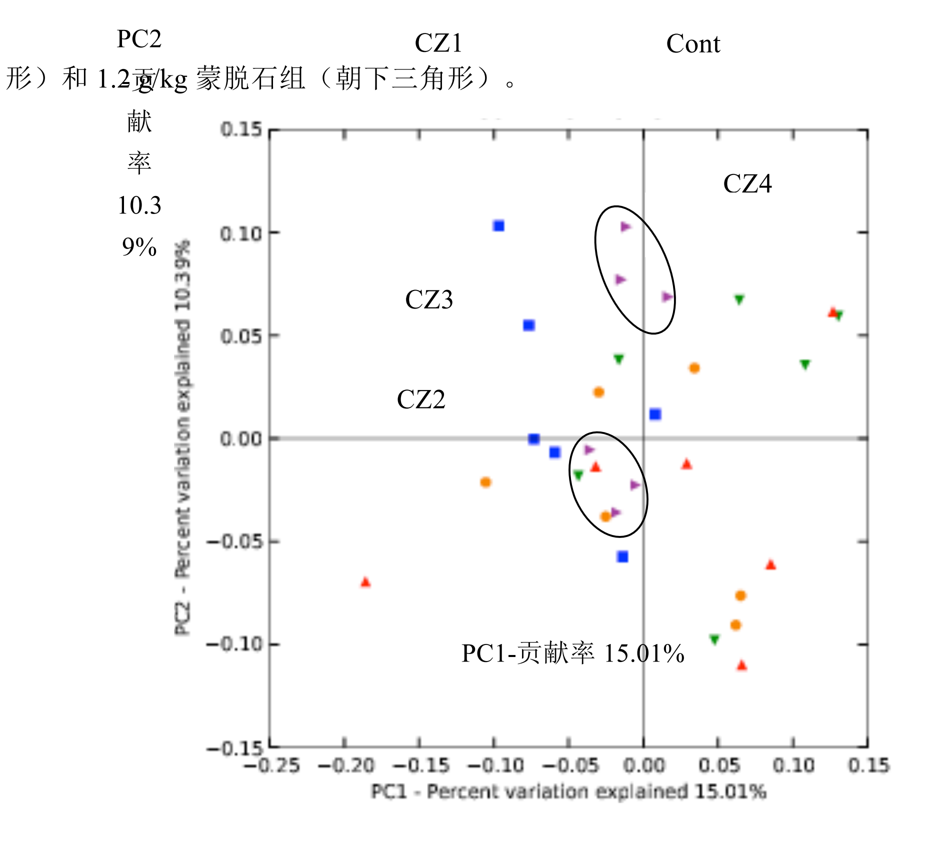


图 2　蒙脱石添加后产蛋鸡肠道菌群 Beta 多样性变化

Fig.2　Change of beta diversity of intestinal microflora after supplementation with montmorillonite

2.5　物种丰度差异性分析

为探讨蒙脱石对盲肠微生物群落结构和组成的影响，在门和属 2 个层次上对同类的 OTU 进行聚类比较研究。由表 4 可知，在门水平上，相对含量大于 0.5%的门共有 7 个，试验得出的其余 9 个菌门相对含量均低于 0.5%，丰度很低。各组中拟杆菌门、厚壁菌门、变形菌门和螺旋体门均为优势菌门，尤其是拟杆菌门和厚壁菌门分别占序列总数的 67.06%~70.34%和 17.30%~21.38%。统计结果表明：试验组中的厚壁菌门、变形菌门和螺旋体门均高于对照组（$P>0.05$）。此外，与对照组相比，0.3 g/kg 蒙脱石组中迷踪菌门显著减少（$P<0.05$）；0.9 g/kg 蒙脱石组中 WPS_2 相对含量显著增加（$P<0.05$）。

表 4　相对含量大于 0.5%（序列占测序总量比例）或差异显著的菌门

Table 4　Bacterial phyla with relative abundance above 0.5%　（sequence percentage of total sequence amount）　or significant difference　　%

项目 Items	蒙脱石添加水平 Montmorillonite supplemental levels/(g/kg)	SEM	*P* 值 *P*-value

	0	0.3	0.6	0.9	1.2		
拟杆菌门 Bacteroidetes	69.70	68.79	67.06	68.54	70.34	0.81	0.634
厚壁菌门 Firmicutes	17.30	20.65	21.28	21.07	21.14	0.54	0.091
变形菌门 Proteobacteria	4.82	5.52	5.31	5.21	5.01	0.24	0.850
螺旋体门 Spirochaetes	1.05	1.21	1.15	1.79	1.08	0.17	0.845
疣微菌门 Verrucomicrobia	0.60	0.57	1.57	0.49	0.41	0.17	0.222
软壁菌门 Tenericutes	0.50	0.76	0.45	0.46	0.44	0.07	0.989
迷踪菌门 Elusimicrobia	0.16[a]	0.03[b]	0.09[ab]	0.10[ab]	0.07[ab]	0.01	0.038
WPS_2	0.08[b]	0.14[ab]	0.06[b]	0.30[a]	0.07[b]	0.02	0.037

由表 5 可知，在属水平上，序列比对得到的 54 个属中共有 11 个菌属相对含量大于 0.5%，产蛋鸡盲肠中有很多相对丰度较低的菌属。在相对含量大于 0.5%的菌属中，各组均以拟杆菌属、考拉杆菌属、颤螺菌属和普氏菌属为优势菌属，且拟杆菌属占测序总量的 24.63%；但各组间以上优势菌属的相对含量均无显著差异（P>0.05）。与对照组相比，试验组中瘤胃球菌属的物种丰度显著提高（P<0.05），紫单胞菌属有增加的趋势（P=0.067）；0.6 和 1.2 g/kg 蒙脱石组多尔氏菌属和布劳特氏菌属的物种丰度显著提高（P<0.05）。此外，0.6 g/kg 蒙脱石组中帕拉普氏菌属的物种丰度显著高于其他 4 组（P<0.05）；试验组中梭杆菌属的物种丰度低于对照组，且数值上随着蒙脱石添加水平的提高而减小（P>0.05）。

表 5　相对含量大于 0.5%（序列占测序总量比例）或差异显著的菌属

Table 5　Bacterial genus with relative abundance above 0.5%（sequence percentage of total sequence amount） or significant difference　%

项目 Items	蒙脱石添加水平 Montmorillonite supplemental levels/(g/kg)					SEM	P 值 P-value
	0	0.3	0.6	0.9	1.2		
拟杆菌属 *Bacteroides*	23.77	23.04	26.41	23.41	26.51	0.82	0.487
考拉杆菌属 *Phascolarctobacterium*	3.78	3.90	2.96	3.89	4.63	0.19	0.178
颤螺菌属 *Oscillospira*	3.62	3.52	4.02	4.05	3.02	0.17	0.522
普氏菌属 *Prevotella*	2.75	3.58	3.18	3.24	3.53	0.25	0.907

脱硫弧菌属 *Desulfovibrio*	2.53	2.58	3.21	2.69	2.03	0.15	0.111
柔嫩梭菌属 *Faecalibacterium*	1.21	0.81	1.54	1.39	1.66	0.15	0.110
紫单胞菌属 *Parabacteroides*	1.82	2.27	2.40	2.06	1.85	0.08	0.067
瘤胃球菌属 *Ruminococcus*	1.10^{c}	1.85^{b}	2.37^{ab}	2.06^{ab}	2.85^{a}	0.15	<0.001
萨特氏菌属 *Sutterella*	1.23	1.54	1.01	1.30	1.36	0.08	0.673
梭杆菌属 *Fusobacterium*	1.87	0.86	0.73	0.62	0.56	0.28	0.242
帕拉普氏菌属 *Paraprevotella*	0.67^{b}	0.99^{b}	2.08^{a}	0.74^{b}	0.81^{b}	0.15	0.010
多尔氏菌属 *Dorea*	0.32^{b}	0.31^{b}	0.70^{a}	0.67^{a}	0.92^{a}	0.07	0.003
布劳特氏菌属 *Blautia*	0.06^{b}	0.05^{b}	0.13^{a}	0.12^{ab}	0.17^{a}	0.02	0.002
丁酸弧菌属 *Butyricimonas*	0.05^{a}	0.02^{b}	0.05^{a}	0.03^{ab}	0.05^{a}	0.01	0.041

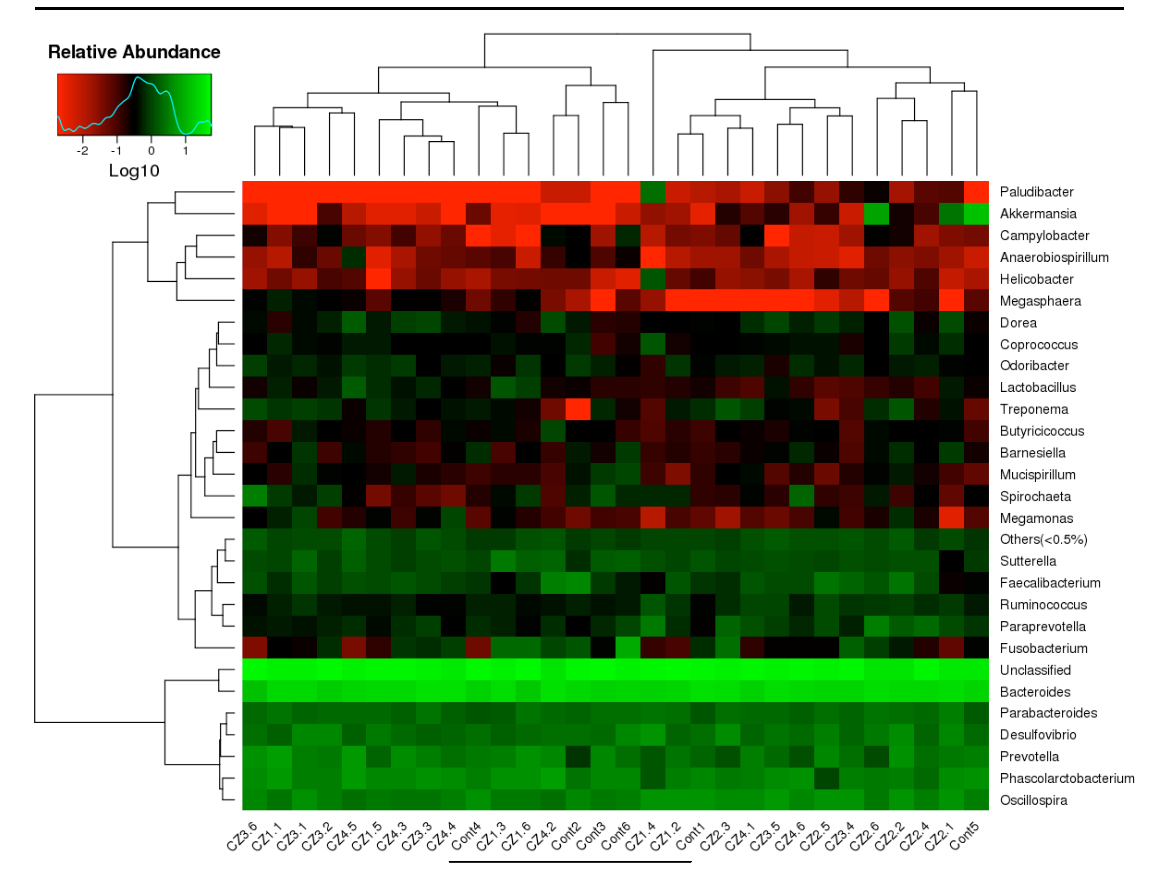


图 3　属水平下 30 个盲肠内容物样品的聚类分析 Heatmap

Fig.3　Heatmap under the genus level of the 30 cecal content samples

将属水平分类信息聚类后得到 Heatmap，见图 3。30 个样品分成 2 大簇，左边第 1 大簇 16 个样品（0.3 g/kg 蒙脱石组 4 个，0.9 g/kg 蒙脱石组 4 个，1.2 g/kg 蒙脱石组 4 个，对照组 4 个），右边第 2 大簇 14 个样品（其中 0.6 g/kg 蒙脱石组 6 个，且有 4 个连续），说明不同

组的样品可以较好地聚在一起，0.6 g/kg 蒙脱石组样品的物种组成与其他 4 组差异性较大。此外，对照组的 6 个样品中有 5 个距离较近（横线），物种组成相似度高；试验组中除 0.3 g/kg 蒙脱石组外，其余 3 组的大部分样品与对照组样品相距较远，尤其是 0.6 g/kg 蒙脱石组，说明物种在对照组与 CZ 组样品间的组成差异性大。总体上，Heatmap 结果与表 5 的结果相吻合。

3 讨 论

3.1 蒙脱石对产蛋鸡生产性能的影响

前人的研究表明蒙脱石能提高产蛋鸡的生产性能。Yenice 等[13]研究指出，饲粮中添加钠质蒙脱石，产蛋鸡产蛋率显著提高，采食量无明显变化；李俊营等[14]报道，饲粮中添加 1.5 g/kg 的载锌纳米蒙脱石，产蛋鸡产蛋率提高了 8.54%，料蛋比降低 2.19%；张军民等[15]也指出，蒙脱石明显提高了产蛋鸡产蛋率，降低蛋的破损率，对采食量无影响。本课题组前期的研究表明，蒙脱石显著提高了产蛋高峰期蛋鸡的产蛋率，有降低料蛋比的趋势[12]；本试验也得出，饲粮中添加 0.9 g/kg 蒙脱石显著提高了产蛋鸡的日产蛋量，试验组料蛋比有降低的趋势，与以上研究结果基本一致。蒙脱石具有巨大的比表面积和良好的吸附性能，能够增加食糜黏度，降低其在消化道内的流通速率，可能有益于饲料养分的吸收、利用；此外，能吸附肠道内有害物质，与消化道中黏液蛋白结合，提高黏液的粘性和柔韧性，从而保护和修复肠道粘膜，维护肠道黏膜屏障[16]。综上所述，饲粮中添加蒙脱石一定程度上能够提高产蛋鸡生产性能，增加经济效益。

3.2 蒙脱石对产蛋鸡盲肠菌群多样性的影响

肠道菌群多样性是促进营养物质吸收、维持机体免疫等生命活动的基础，多样性增加有利于机体新陈代谢和免疫防御，进而益于宿主健康[17]。本研究表明，饲喂蒙脱石后产蛋鸡盲肠菌群测序数量试验组与对照组之间没有显著差异，但 0.9~1.2 g/kg 蒙脱石组的有效序列和优质序列均多于对照组，说明肠道微生物种类有所增加。此外，试验组中反映 Alpha 多样性丰富度和均匀度的 Shannon 指数较对照组有提高趋势，而 Simpson 指数有降低趋势（Simpson 指数越小说明样品中物种越丰富）；且 PCoA 方法分析 Beta 多样性发现试验组菌群结构分布相对零散，相似度较低，菌群多样性提高。王聪[11]利用 PCR-DGGE 技术研究不同水平蒙脱石对奶牛瘤胃微生物区系的影响，发现随着蒙脱石添加量的增加，奶牛瘤胃微生物 Shannon 指数逐渐降低，且添加 2.5%和 5.0%蒙脱石组较对照组显著降低，说明瘤胃菌群多样性降低，与本试验结果不一致。造成结果差异的可能原因有试验动物、蒙脱石种类及添加量、试验条件和检测方法等。目前，尚未有关于蒙脱石对产蛋鸡肠道菌群多样性影响的报

道，其是否影响产蛋鸡肠道菌群多样性还有待进一步探讨。

3.3 蒙脱石对产蛋鸡盲肠菌群结构和物种丰度的影响

家禽肠道中的优势菌群与人类相似，优势菌群为拟杆菌门和厚壁菌门，在肠道微生物中占比约为 90%[18]。本研究中拟杆菌门和厚壁菌门占比在 88%以上，蒙脱石添加后 2 个优势菌门的总占比没有发生显著变化，但厚壁菌门的物种丰度较对照组有提高趋势。据报道，厚壁菌门与动物饲粮消化有关，对饲粮养分的消化吸收有帮助作用[19]。有研究指出，酒精性肝损伤模型大鼠粪便中厚壁菌门的物种丰度显著降低，迷踪菌门的物种丰度明显提高，反映肠黏膜屏障功能状况的血清 *D*-乳酸和二胺氧化酶水平显著提高、肠黏膜叉头样转录因子 3 表达降低，提示肠道损伤发生，而添加益生菌后以上指标均恢复到正常水平[20]。本试验发现，试验组迷踪菌门的物种丰度均有降低，其中 0.3 g/kg 蒙脱石组达到显著水平。此外，0.9 g/kg 蒙脱石组 WPS_2 菌门相对含量显著提高，由于此菌门在肠道菌群中占比较低，其功能作用研究也鲜有报道，有待进一步探讨。以上结果提示蒙脱石可能与益生菌一样发挥改善肠道微生物失衡、修复肠黏膜屏障功能的作用。

在属水平上，我们发现在相对含量大于 0.5%或有显著差异的菌属中，试验组中绝大多数菌属的物种丰度均高于对照组，进一步说明蒙脱石在一定程度上提高了产蛋鸡盲肠菌群的丰度和多样性。与对照组相比，0.6~1.2 g/kg 蒙脱石组中瘤胃球菌属、多尔氏菌属和布劳特氏菌属的物种丰度显著提高。研究表明，这些菌属物种丰度的提高与肠道健康密切相关。郭壮[21]研究指出，瘤胃球菌属是健康人肠道中共有的少数细菌属之一；Wang 等[1]研究发现小鼠暴露于不同浓度的黄曲霉毒素 B_1 后肠道中瘤胃球菌属的物种丰度明显降低。据报道，布劳特氏菌属和多尔氏菌属均为肠道中有益菌属，具有产生短链脂肪酸的功能，对于维持肠道上皮细胞形态和功能具有一定作用[21]。此外，蒙脱石还提高了肠道中紫单胞菌属和帕拉普氏菌属的物种丰度，这 2 种细菌属是肠道内具有保护性功能的菌群。研究发现，与正常人相比，溃疡性结肠炎患者粪便微生物中紫单胞菌属的表达水平降低，并推测此菌属的缺失可能与肠道炎症有关[22]。高仁元等[23]利用 PCR-DGGE 技术研究表明，结肠癌大鼠粪便菌群中帕拉普氏菌属的丰度较正常大鼠显著降低。另外，本试验中，我们发现试验组中梭杆菌属的物种丰度有逐步降低的趋势。梭杆菌属是拟杆菌科的一个菌属，包含坏死梭杆菌和核梭杆菌等多种致病菌，对动物和人类均具有毒害作用。苗慧芳等[24]研究表明，结直肠癌患者粪便中梭杆菌属的丰度明显高于健康人，提示此菌属数量增加可能与肠道疾病有关。同时，本研究也发现蒙脱石降低了肠道中其他少数细菌属的物种丰度，但这些菌属相对含量很低，且统计学上无显著差异，或许不能作为评判蒙脱石是否影响肠道微生物群落丰度和多样性的标志性

菌群。

目前，国内外关于蒙脱石对动物肠道菌群影响的报道中，多数研究人员采用传统体外培养的方法，只能有限地探讨特定几种微生物的变化，对众多厌氧细菌、未知微生物以及微生物多样性等均未涉及，因此不能充分评估蒙脱石对肠道菌群的作用。本研究应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术探究了蒙脱石对产蛋鸡盲肠菌群多样性及物种丰度的影响，发现蒙脱石改变了盲肠微生物中部分菌群的物种丰度。前人的研究也表明，蒙脱石减少了肉鸡、仔猪肠道中大肠杆菌、梭菌和沙门氏菌等有害菌的数量[7, 25-27]；降低了奶牛瘤胃中病原菌——弗氏志贺菌属的物种丰度[11]；减少了尼罗罗非鱼肠道中气单胞菌属、黄杆菌属和弧菌属等细菌属的百分比，增加了芽孢杆菌属和棒杆菌属的百分比[28]。可见，蒙脱石在一定程度上影响了动物肠道中微生物的组成及丰度。鉴于瘤胃球菌属、多尔氏菌属、布劳特氏菌属、帕拉普氏菌属、紫单胞菌属物种丰度的提高和梭杆菌属丰度的降低与维持肠道正常功能的相关性，故可以将这些菌群丰度的变化作为蒙脱石改善肠道微生物失衡、维护肠道健康的菌群标志物。

4　结　论

①　饲粮中添加 0.9 g/kg 蒙脱石显著提高了产蛋末期蛋鸡日产蛋量，有利于延长蛋鸡的产蛋周期。

②　饲喂蒙脱石后，产蛋鸡盲肠微生物 Beta 多样性一定程度上提高，部分菌群的物种丰度发生变化。在门水平上，蒙脱石有提高厚壁菌门物种丰度的趋势，0.3 g/kg 蒙脱石组迷踪菌门丰度显著降低；在属水平上，0.6~1.2 g/kg 蒙脱石组中瘤胃球菌属、多尔氏菌属、布劳特氏菌属和帕拉普氏菌属的物种丰度提高，梭杆菌属的物种丰度有逐步降低的趋势。

③　肠道中这些菌属丰度的变化与肠道健康密切相关，提示这些菌属可能是蒙脱石维持肠道微生物屏障的标志性菌群，且可能对改善产蛋鸡的生产性能有一定作用。

参考文献：

[1]　WANG J C,TANG L L,GLENN T C,et al.Aflatoxin B_1 induced compositional changes in gut microbial communities of male F344 rats[J].Toxicological Sciences,2016,150(1):54–63.

[2]　杨俊花,赵志辉,郭文博,等.应用 Illumina-MiSeq 高通量测序技术分析脱氧雪腐镰刀菌烯醇对小鼠肠道菌群的影响[J].动物营养学报,2017,29(1):158–167.

[3]　GOSAIN A,GAMELLI R L.Role of the gastrointestinal tract in burn sepsis[J].Journal of Burn Care & Rehabilitation,2005,26(1):85–91.

[4]　PROST A E,RIEMANN H.Food-borne salmonellosis[J].Annual Review of

Microbiology,2003,21:495–528.

[5] MURRAY H H.Traditional and new applications for kaolin,smectite,and palygorskite:a general overview[J].Applied Clay Science,2000,17(5/6):207–221.

[6] DI GREGORIO M C,DE NEEFF D V,JAGER A V,et al.Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds[J].Toxin Reviews,2014,33(3):125–135.

[7] XIA M S,HU C H,XU Z R,et al.Effects of copper-bearing montmorillonite on growth performance,digestive enzyme activities,and intestinal microflora and morphology of male broilers[J].Poultry Science,2004,83(11):1868–1875.

[8] HU C H,QIAN Z C,SONG J,et al.Effects of zinc oxide-montmorillonite hybrid on growth performance,intestinal structure,and function of broiler chicken[J].Poultry Science,2013,92(1):143–150.

[9] 郭彤,吴艳,李晓晨,等.Cu^{2+}/ZnO^{-}蒙脱石对断奶仔猪生长性能、肠道菌群、黏膜二糖酶活性及肠黏膜形态的影响[J].中国畜牧杂志,2016,52(17):48–53,59.

[10] SONG J,LI Y L,HU C H,et al.Effects of copper-exchanged montmorillonite,as alternative to antibiotic,on diarrhea,intestinal permeability and proinflammatory cytokine of weanling pigs[J].Applied Clay Science,2013,77–78:52–55.

[11] 王聪.蒙脱石对泌乳奶牛胃肠道发酵及瘤胃微生物区系的影响[D].硕士学位论文.兰州:甘肃农业大学,2013.

[12] 陈继发,罗玲,曲湘勇,等.霉菌毒素吸附剂对产蛋鸡生产性能、蛋黄中微量元素含量、血清抗氧化和生化指标的影响[J].动物营养学报,2016,28(10):3183–3191.

[13] YENICE E,MIZRAK C,CEYLAN N,et al.Effects of dietary sodium bentonite and mnnan oligosaccharide supplementation on performance,egg quality,blood and digestion characteristics of laying hens fed aflatoxin contaminated diet[J].Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi,2015,21(2):211–218.

[14] 李俊营,詹凯,陈旭伍,等.日粮添加霉菌毒素吸附剂对蛋鸡生产性能和蛋品质的影响[J].西北农业学报,2012,21(10):7–11.

[15] 张军民,李桂甫,韩怀动,等.霉菌毒素吸附剂对蛋鸡生产性能的影响[J].饲料广角,2006(5):35–36.

[16] ALBENGRES E,URIEN S,TILLEMENT J P,et al.Interactions between smectite,a mucus stabilizer,and acidic and basic drugs:*in vitro* and *in vivo* studies[J].European Journal of Clinical

Pharmacology,1985,28(5):601–605.

[17] HILDEBRAND F,NGUYEN T L,BRINKMAN B M,et al.Inflammation-associated enterotypes,host genotype,cage and inter-individual effects drive gut microbiota variation in common laboratory mice[J].Genome Biology,2013,14(1):R4.

[18] BEZIRTZOGLOU E,TSIOTSIAS A,WELLING G W,et al.Microbiota profile in feces of breast- and formula-fed newborns by using fluorescence *in situ* hybridization(FISH)[J].Anaerobe,2011,17(6):478–482.

[19] 徐帅,林奕岑,周梦佳,等.基于高通量测定肉鸡回肠微生物多样性及 PICRUSt 基因预测分析[J].动物营养学报,2016,28(8):2581–2588.

[20] 梁惠,吕锐,傅泳,等.益生菌对大鼠酒精性肝损伤的保护作用及机制研究[J].中国药理学通报,2016,32(7):991–997.

[21] 郭壮.应用焦磷酸测序技术对不同人群肠道微生物群落结构的研究[D].博士学位论文.无锡:江南大学,2013.

[22] NOOR S O,RIDGWAY K P,SCOVELL L,et al.Ulcerative colitis and irritable bowel patients exhibit distinct abnormalities of the gut microbiota[J].BMC Gastroenterology,2010,10:134.

[23] 高仁元,朱庆超,伍雯,等.肠癌大鼠与正常大鼠粪便菌群的结构性差异[J].世界华人消化杂志,2014,22(5):661–667.

[24] 苗慧芳,武娜,栾春光,等.结直肠腺瘤及结直肠癌患者肠道中梭杆菌属与产丁酸菌的定量研究[J].微生物学报,2014,54(10):1228–1234.

[25] 马玉龙,郭彤,许梓荣.纳米载铜蒙脱石对断奶仔猪腹泻、肠道菌群及肠粘膜形态的影响[J].中国兽医学报,2007,27(2):279–283.

[26] 马玉龙,许梓荣,郭彤,等.无机铜/蒙脱石纳米材料对肉鸡生长、肠道菌群和细菌酶活的影响[J].中国畜牧杂志,2006,42(11):28–31.

[27] HU C H,GU L Y,LUAN Z S,et al.Effects of montmorillonite-zinc oxide hybrid on performance,diarrhea,intestinal permeability and morphology of weanling pigs[J].Animal Feed Science and Technology,2012,177(1/2):108–115.

[28] 胡彩虹,徐勇,熊莉,等.载铜蒙脱石对尼罗罗非鱼肠道菌群和消化机能的影响[J].水生生物学报,2008,32(6):881–888.

Effects of Montmorillonite on Performance and Cecal Microflora of Laying Hens

CHEN Jifa[1,2] PENG Canyang[1,2] QU Xiangyong[1,i*] JI Fang[3]

(1. *College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University*, *Changsha* 410128, *China*; 2. *Hunan Co-Innovation Center of Animal Production Safety*, *Changsha* 410128, *China*; 3. *Amlan International*, *Chicago* IL 60611, *USA*)

Abstract: This study was conducted to investigate the effects of montmorillonite on performance and cecal microflora of laying hens. Four hundred-eighty Brown Lohmann hens (75 weeks old) were randomly assigned to 5 groups, each of which comprised 8 replicates of 12 hens per replicate. Hens in the control group were fed a basal diet, and hens in experimental groups were fed the basal diets supplemented with 0.3, 0.6, 0.9 and 1.2 g/kg montmorillonite, respectively. The adjustment period lasted for 7 days, and the experimental period lasted for 70 days. The results showed as follows: 1) compared with the control group, the daily egg production of 0.9 g/kg montmorillonite group was significantly increased (P<0.05), and feed to egg ratio in experimental groups tended to be higher (P=0.073) than that in the control group during 1 to 5 weeks of the experiment. 2) The quantities of effective sequences and good sequences observed in 0.3, 0.9 and 1.2 g/kg montmorillonite groups were more than those in the control group (P>0.05). 3) The Beta diversity was improved in the experimental groups. The Shannon index in experimental groups tended to be higher than that in the control group (P=0.096), and the Simpson index tended to be lower than that in the control group (P=0.095). 4) At the phylum level, compared with the control group, the abundances of Firmicutes, Proteobacteria and Spirochaetes in the experimental groups were numerically increased (P>0.05); the relative content of WPS_2 in 0.6 g/kg montmorillonite group was significantly increased (P<0.05), and the Elusimicrobia abundance in 0.3 g/kg montmorillonite group was significantly decreased compared with the control group (P<0.05). At the genus level, compared with the control group, the *Ruminococcus* abundance in the experimental groups was significantly increased (P<0.05), and the *Parabacteroides* abundance in experimental groups tended to be higher than that in the control group (P=0.067); the abundances of *Dorea* and *Blautia* in 0.6 and 1.2 g/kg montmorillonite groups were significantly increased (P<0.05); the *Paraprevotella* abundance in 0.6 g/kg montmorillonite group was significantly increased (P<0.05). 5) The cluster analysis at the genus level showed low similarity of intestinal microflora between the experimental groups and the control group. In conclusion, the bacterial diversity and species abundance of cecal microbiota of laying hens can be partially influenced by

montmorillonite, and dietary supplementation with 0.9 g/kg montmorillonite tends to improve the egg production of laying hens.

Key words: montmorillonite; performance; intestinal microbiota; high-throughput sequencing; laying hens

---

*Corresponding author, professor, E-mail: quxy99@126.com （责任编辑　田艳明）